

実験動物セミナー 第25回研究成果発表会 抄録

Abstract of the 25th Seminar of Laboratory Animal Center

(平成27年3月5日受理)

日時: 平成26年12月17日(水) 14:30~17:00

場所: 山形大学医学部交流会館 会議室

【一般講演1】

K-Ras/JNK 経路の抑制は膀胱癌幹細胞を除去し膀胱腫瘍形成を抑制する

○岡田雅司¹、澁谷慶太^{1,5}、佐藤 篤^{1,2}、鈴木修平^{1,3}、清野 学^{1,4}、北中千史^{1,5,6}

(1 山形大学医学部・腫瘍分子医科学講座、2 脳神経外科学講座、3 臨床腫瘍学講座、4 産婦人科学講座、5 先端分子疫学研究所・悪性腫瘍研究センター、6 メディカルサイエンス推進研究所)

膀胱癌は K-Ras 遺伝子の恒常活性型変異が高頻度で見出される、極めて予後の悪い癌の一つであることが知られており、その中でも自己複製能や腫瘍創始能を有する膀胱癌幹細胞は、膀胱癌に蔓延する治療抵抗性の原因であると考えられている。しかしながら、今日まで、多くの膀胱癌幹細胞をはじめとする癌幹細胞の制御法は不明であり、また K-Ras の癌幹細胞性維持における役割もいまだ知られていない。今回我々は、K-Ras/JNK 経路が膀胱癌幹細胞の幹細胞性の維持に対し、中心的な役割を果たしているということを報告する。

In vitro において、JNK を特異的阻害薬である SP600125 による薬理学的処理、もしくは JNK に対する siRNA を用いて抑制すると、膀胱癌幹細胞の幹細胞性が失われ、腫瘍形成も抑制された。また、in vivo において SP600125 をヌードマウスに投与すると、移植した腫瘍中の膀胱癌幹細胞が効率的に枯渇することが見出され、その結果、再移植実験において SP600125 投与群由来の腫瘍細胞移植では明らかに腫瘍形成が抑制された。この JNK の上流因子のひとつとして、K-Ras の活性化が知られており、膀胱癌において K-Ras は活性型の遺伝子変異を有している事が非常に多いことがわかっている。我々は、恒常活性型 K-Ras 変異を有する膀胱癌幹細胞に対し K-Ras 遺伝子のノックダウンを試みた。すると JNK の不活性化が誘導され、それに伴い癌幹細胞性および腫瘍形成能が減少することが示された。

以上のことから、膀胱癌幹細胞は活性型 K-Ras により JNK 経路が活性化され、幹細胞性の維持および腫

瘍形成能を制御すること、そして、この K-Ras/JNK 経路が膀胱癌における直接の治療標的になりうることが示唆された。

【一般講演2】

Apurinic/apyrimidinic endonuclease1/redox factor-1 (Ape1/Ref-1) modulates T cell response through its redox function

○ Akhter Nasrin¹, Yuji Takeda¹, Hidetoshi Nara¹, Akemi Araki¹, Naoto Ishii² and Hironobu Asao¹

(1Department of Immunology, Yamagata University Faculty of Medicine,

2Department of Immunology, Tohoku University Graduate School of Medicine)

【Background and Purpose】Ape1/Ref-1, which is a multifunctional protein possessing DNA repair, redox control and transcriptional regulatory activities, has an important role in controlling cellular response to oxidative stress. T cell immune responses are essential for various pathological infections and inflammations in oxidative conditions. Many studies have discussed the T cell response during oxidative stress. However, the function of Ape1/Ref-1 in T cell immune responses is not well investigated. In the present study, we analyzed the role of redox function of Ape1/Ref-1 in T cell activation.

【Methods and Results】Mouse whole splenocytes were stimulated with lectin, Concanavalin A (ConA) for 3 days in the presence or absence of E3330, which is a specific inhibitor of Ape1/Ref-1 redox activity. IFN- γ -producing cells were assessed by intracellular staining and flowcytometry analysis. E3330 enhanced IFN- γ -producing CD4⁺ T cells upon ConA stimulation. To confirm this result, splenocytes from ovalbumin (OVA)-specific TCR-expressing OT-II transgenic mice were stimulated with OVA in the presence or absence of E3330.

E3330 again enhanced IFN- γ -producing OVA-specific CD4⁺ T cells.

Next, we examined whether E3330 modulates the function of CD4⁺ T cells or antigen presenting cells (APC). E3330-pretreated OVA-pulsed bone marrow-derived dendritic cells up-regulated IFN- γ -producing OT-II T cells. This result suggested that E3330 enhanced Th1 response through the alteration of APC function. Then we assessed the surface expression of MHC-II and co-stimulatory molecules: CD80 and CD86 on APC in the presence or absence of E3330. However, we did not find any significant difference of the surface expression of these molecules in the presence or absence of E3330. Now we focus on several cytokines that mediate CD4⁺ T cell differentiation as 3rd signals from APC.

【Conclusions】 Our findings suggest that the redox function of Ape1/Ref-1 is a modulator of T cell activation and may inhibit Th1 cell differentiation through the modification of APC.

【一般講演 3】

SOD1 欠損マウスにおける脂肪肝形成の分子機構

○李在勇¹、姜恩實¹、倉橋敏裕¹、本間拓二郎¹、鍋島篤典²、山田壮亮²、中山敏幸²、藤井順逸¹
(1 山形大学大学院医学系研究科生化学分子生物学、2 産業医科大学第二病理学)

スーパーオキシドを消去する SOD1 を欠損すると消化管における脂質の吸収が障害され、内臓脂肪はほとんど蓄積しないにもかかわらず、肝臓に脂肪が沈着する。SOD1 欠損マウスを高脂肪食で飼育した場合でも、絶食時の血中トリアシルグリセロール量は野生型マウスに認められるほど増加せず、低値を示す。この結果は、SOD1 欠損マウスでは、酸化ストレスによる肝臓での脂質合成の亢進とリポタンパク質の分泌抑制が起り、それが原因となって脂肪肝となることを示唆している。

SOD1 欠損マウスの肝臓では、小胞体ストレスマーカーである BiP や CHOP の発現が増加しており、小胞体ストレス状態にある。脂質合成を制御する転写調節因子 SREBP1・2 は小胞体膜タンパクとして存在し、コレステロールの低下によりゴルジ体で切断され、核に移行して脂質合成に関わる遺伝子の転写促進に働く。SREBP1 の発現量を調べたところ、SOD1 欠損マウスでは活性型の増加が認められた。SREBP の切

断・活性化に働く protease である S1P・S2P は、小胞体ストレスの際に Unfolded Protein Response に働く遺伝子の発現調節を担う転写調節因子の ATF6 を切断・活性化する酵素と同一であるため、小胞体ストレスは ATF6 とともに SREBP を活性化し、脂肪合成を亢進させると考えられる。

一方、初代培養した肝細胞では脂肪滴形成に関わる Perilipin 2 の発現が亢進し、野生型でも脂肪蓄積が増加する。SOD1 欠損マウスの初代培養肝細胞では、野生型マウスの肝細胞に比べて多くの脂肪蓄積が認められる。さらに、小胞体で蛋白質の酸化的折畳みに関わる Prdx4 を欠くマウスは肝臓に異常を認めないが、Prdx4 と SOD1 の二重欠損マウスは、SOD1 欠損では認められない顕著な肝障害を示す。

以上の結果は、SOD1 欠損により増加した活性酸素が蛋白質の酸化的折畳みを障害して小胞体ストレスを惹起し、Prdx4 非存在下ではそれが増強されることを示している。現在、酸化ストレスと小胞体ストレスの脂肪肝形成への関与について、こうした遺伝子改変マウスの初代培養肝細胞を用いた分子機構の解明を進めている。

【一般講演 4】

High-mobility Group Box 1 Attenuates Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis via Heat Shock Protein Beta 1 Induction in Doxorubicin-induced Cardiomyopathy

○ Taro Narumi, Tetsuro Shishido, Shinpei Kadowaki, Yuki Honda, Miyuki Yokoyama, Daisuke Kinoshita, Tetsuya Takahashi, Tetsu Watanabe, Isao Kubota
(Department of Cardiology, Pulmonology, and Nephrology, Yamagata University School of Medicine)

Abstract

Aims: The apoptosis of cardiomyocytes is believed to account for the cardiotoxicity of doxorubicin. Cardiomyocyte apoptosis contributes to loss of myocardial tissue and contractile dysfunction. Given that high-mobility group box 1 (HMGB1) is a nuclear DNA-binding protein capable of inhibiting apoptosis, we aimed to clarify the role of HMGB1 on heat shock protein beta 1 (HSPB1) expressions during doxorubicin-induced cardiomyopathy.

Methods and Results: Overexpression of HMGB1 extremely enhanced heat shock element promoter

activity. Furthermore, overexpression of HMGB1 increased the binding of HMGB1 to heat shock factor 2. As a result, transfection with HMGB1 increased the expression of HSPB1 at the protein and mRNA levels, and inhibited mitochondrial dysfunction and apoptosis after exposure of cardiomyocytes to doxorubicin. Silencing of HSPB1 abrogated the inhibitory effect of HMGB1 against cardiomyocyte apoptosis. To investigate these effects in vivo, doxorubicin was administrated to both transgenic mice with cardiac-specific overexpression of HMGB1 (HMGB1-Tg) as well as to their wild-type littermates (WT). Levels of HSPB1 after doxorubicin administration were significantly higher in HMGB1-Tg mice than in WT mice. The mitochondrial damage observed in doxorubicin-treated WT mice were suppressed in doxorubicin-treated HMGB1-Tg mice. Cardiomyocyte dysfunction after doxorubicin administration was attenuated in HMGB1-Tg mice compared with WT-mice. As a result, the survival rate after doxorubicin administration was higher for HMGB1-Tg mice than for WT mice.

Conclusions: We report the first in vivo and in vitro evidence that cardiac HMGB1 attenuates mitochondrial dysfunction and cardiomyocyte apoptosis associated with doxorubicin-induced cardiomyopathy through induction of HSPB1 expressions.

【一般講演 5】

マウス圧迫創における HMGB1 陽性細胞分布の特徴

松田友美¹、高橋勇太²、菅野恵美³、○石田陽子¹

(1 山形大学医学部看護学科、2 山形大学大学院医学系研究科看護学専攻、3 東北大学大学院医学系研究科保健学専攻)

【目的】 深部損傷褥瘡 (DTI) は初期に表皮の連続性の破綻はないが、深部では炎症が惹起された後に深い褥瘡となるため初期段階での介入が重要と考えられる。創傷治癒の過程で生体内の細胞応答に介入する無数の化学的メディエーターの中で初期の細胞リクルート上重要な因子として近年注目される High Mobility Group Box 1 (HMGB1) が褥瘡において持つ役割は不明である。本研究では褥瘡の重症化と HMGB1 の関連の解明に向けて圧迫創動物モデルを用い、創部組織

における HMGB1 陽性細胞分布の特徴を明らかにすることを目的とした。

【方法】 6 週齢の JCL/ICR 雄性マウスを用いた。褥瘡を模した圧迫創はネオジム磁石 2 つを用い 1 つは腹腔内、もう 1 つは腰背部の皮膚側から装着し深部骨格筋を含む皮膚全層を 6 時間圧迫後に再度麻酔下で皮膚側の磁石を除去して作製した。1,3,5,7 日目 (各日 n=3) に深部骨格筋も含め皮膚全層を摘出した。一般染色、抗 HMGB1 による免疫組織化学染色を施行し陽性細胞を観察した。

【結果】 肉眼的所見として、1～2 日目は蒼白 3～5 日目から創中心領域が黄褐色となり 6～7 日目では痂皮化した。組織学的には、主に創中心の特徴を以下に示す。1 日目、表皮の基底層は扁平となったが連続性は保たれ、好中球は主に皮下組織と骨格筋の疎性結合組織にみられた。HMGB1 陽性細胞は、圧迫部における表皮基底層の数か所と毛母基で一部消失していた。真皮層と筋層では HMGB1 陽性細胞が顕著に減少したが、疎性結合組織内では好中球やマクロファージ、単球など炎症性細胞が HMGB1 陽性を示していた。3 日目表皮基底層では、表皮の痂皮形成部周囲で HMGB1 陽性細胞の消失がみられた。皮下組織や筋層では HMGB1 陽性細胞が顕著な減少を認め、1 日目同様に炎症性細胞は HMGB1 陽性を示した。炎症性細胞は創縁部から浸潤し炎症が波及していた。7 日目には表皮基底層が HMGB1 陽性を示し、規則的に基底層を形作っていた。真皮層の浅層では HMGB1 陽性細胞の減少が回復していない部分が認められた。5～7 日目では再生した筋細胞や結合組織の核においても顕著な HMGB1 陽性を示した。

【考察】 細胞が障害を受けると、細胞から HMGB1 ペプチドが放出され血液を介して全身の炎症に関与することが知られている。本研究では圧迫を受けた組織の HMGB1 陽性細胞の減少が認められており、細胞からの HMGB1 ペプチドの放出が示唆される。また圧迫部の表皮に痂皮が形成され、毛母基においても HMGB1 陽性が消失し毛包が消失する。さらに皮下組織、筋層では炎症性細胞が HMGB1 陽性を示し炎症が続発することから、HMGB1 は圧迫創においても炎症の誘導に関連することが示唆された。

【一般講演 6】

静脈炎に対する電法の作用に関する実験的研究

○石田陽子¹、小高亜由美²、高橋勇太³、松田友美¹

(1 山形大学医学部看護学科、2 埼玉県立がん

センター、3 山形大学大学院医学系研究科看護学専攻)

【目的】

抗がん剤治療における副作用の一つに静脈炎がある。抗がん剤の刺激性による静脈炎は化学性静脈炎に分類され、薬液の pH や浸透圧が要因とされている。また、静脈炎発生時やその予防的ケアは看護師個々の判断によるところが大きく、複数のケアを併用するため、それぞれ単独での効果は明らかになっていない。そこで本研究では、抗がん剤投与による静脈炎を実験動物(ウサギ)を用いて作製し、静脈炎の病態を組織学的により詳細に観察すること、作製した静脈炎に対し、臨床で行われている罨法を実施し、その効果について組織学的に検討することを目的に実験を行なった。

【方法】

ウサギの耳介静脈に 0.6mg/ml のビノレルビン酒石酸塩を 3ml 注入し、薬液を留まらせるため 5 分間駆血した。薬液を注入、5 分間の駆血後、冷罨法は 17~20℃、温罨法は 38~40℃に保持したゲルパックを用い、耳介にそれぞれ 20 分間施行した。薬液注入および罨法施行後 24 時間、72 時間にそれぞれ耳介静脈を摘出(各時 n=4)し、光学顕微鏡にて観察、組織病理学的評価を行なった。

【結果と考察】

肉眼的には薬液注入後はどのウサギも耳介静脈と周囲の血管が拡張し、24 時間後には耳介静脈の拡張とともに耳介に発赤が認められた。72 時間後には耳介静脈の拡張はみられず、発赤がみられ、肉眼的には大きな違いを認められなかった。組織学的観察において、24 時間後には耳介静脈周囲に浮腫がみられた。また、血管内皮の傷害や血栓がみられ、72 時間後にはその程度が重症化していた。72 時間後の病態を比較すると、薬液注入のみ施行したウサギが最も重症で、次いで薬液注入後に温罨法を施行したウサギ、薬液注入後に冷罨法を施行したウサギが最も病態が軽症であった。これらのことから、静脈炎が発生した際に行う看護ケアとしては冷罨法が最も有効であり、温罨法は適切ではないと考えられた。

【結論】

1. 本実験で作製したウサギの耳介静脈を用いた抗がん剤(ビノレルビン酒石酸塩)による静脈炎実験評価系は、それに対する看護ケアの評価系として有用である。
2. 本実験条件下において、抗がん剤(ビノレルビン酒石酸塩)による静脈炎が発生した際のケアとしては、温罨法を施行するよりも冷罨法の方が静脈炎の病態を軽症にとどめる可能性がある。

【一般講演 7】

慢性アルコール投与が記憶に及ぼす影響

○藤原浩樹、金子健也、植木千恵、小菅 桃、川村菜葉子、宍戸瑛理、堀 聡美、藤井 聡
(生理学講座)

【要旨】

アルコールの急性的な摂取によるアルコール性記憶障害は一般に広く知られているが、アルコールの慢性投与による影響に関しては不明な点が多い。本実験では、恐怖条件づけを用いて、記憶の記銘と想起に重点を置いて検討する。条件刺激には光刺激、無条件刺激には電撃を対呈示し、消去では条件刺激のみの呈示を行い、アルコールの慢性投与が記憶にあたえる影響について検討した。また、Rota-rod test を用いてアルコールが運動協調性に与える影響を検討した。

【方法】

Rota-rod test では、被験体は 10 週齢のウィスター系雄性ラットを用いた。被験体の飼育環境は 22 ± 2℃、湿度 50 ± 10%、12/12 時間の明暗サイクル(午前 6 時の点灯)で維持した。被験体は 7 日間、食餌と水は自由摂取状況下で飼育され、その後約 1 か月間、アルコール飼料またはコントロール飼料の食餌制限下で飼育した。実験に先立ってすべての被験体はハンドリングを経験した。

恐怖条件づけでは、被験体は 16 週齢ウィスター系雄性ラットを用いた。飼育方法は Rota-rod test と同様である。被験体は約 3 か月間、アルコール飼料またはコントロール飼料の食餌制限下で飼育した。

【結果】

恐怖条件づけでは、慢性アルコール投与が記憶の記銘、想起に影響を及ぼすか検討した。条件づけでは、慢性アルコール投与の有無では差が認められなかったが、試行回数が増加するごとに恐怖が獲得された。よって、アルコールの慢性投与は記憶の記銘に影響しなかった。また、消去手続きでコントロールに比べ慢性アルコール投与が恐怖記憶の想起されにくいことが示された。

Rota-rod test を用いてアルコールの慢性投与が運動協調性へ及ぼす影響について検討した。慢性アルコールの投与の濃度差の違う群どうしでも運動成績が異なり、濃度の高い慢性アルコール投与群がより運動協調性の成績が悪いことが示された。

以上より、恐怖条件づけでは、慢性アルコール摂取が恐怖記憶の想起を悪くしたと結論した。また、Rota-rod test でも、慢性アルコール投与が運動協調性も悪くしたと結論した。以上より、慢性アルコール

投与により運動協調性、恐怖記憶の想起に影響を及ぼすことが示された。

【一般講演 8】

ALA 合成酵素遺伝子破壊マウスヘテロ接合体に対するマウス用トレッドミルを用いた運動持久力の解析

○野原豪¹、斉藤真一¹、中野 博¹、村上綾子¹、白澤信行²、高橋 究³、田中 徹³、中島元夫³、中島 修¹

(1 山形大学医学部遺伝子実験センター、2 山形大学医学部解剖一、3 SBI ファーマ)

ヘム生合成系律速酵素 5- アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS) の非組織特異型アイソザイム ALAS1 は、全ての組織で発現しており、ヘモグロビンやミトコンドリア電子伝達系酵素などのヘムタンパク質にヘムを供給している。我々が確立した、ALAS1 遺伝子破壊マウスは発生初期に胎生致死し、ALAS1 が胎児発生に必須であることが明らかとなった。一方、ヘテロ接合体 (ALAS1+/- マウス) には、顕著な表現型を認めていなかった。

先行研究によって、ALAS1+/- マウスに対し経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT) およびインスリン負荷試験 (ITT) を行ったところ、耐糖能異常およびインスリン抵抗性があることを認めた。さらに、ALAS1+/- マウスはミトコンドリアの形態異常とミトコンドリアゲノム量が低下していることが示唆された。ALAS1+/- マウスで見られた糖代謝異常は、電子伝達系酵素群へのヘムの供給が欠乏され、ミトコンドリア機能が低下したことにより惹起されたと考えられる。

そこで、ALAS1+/- マウスのミトコンドリア機能を評価するために、マウス用トレッドミル (MK-690S; 室町機械製) を用いた運動負荷試験を行い、運動機能を解析した。トレッドミルは回転式のベルトの上にマウスを走行させ、ベルト後部にある金属製のショッカーユニット (電気刺激付与電極) にふれると電気刺激を与え、強制的に持続走行させる。

本研究では、ベルト走行への慣れと電気刺激への条件づけのために、事前に 2 日間の短時間トレーニング走行を行った後、3 日目に走行試験を行った (傾斜角 15° ; 速度 10-20m/min; 時間 60min)。持久運動におけるエネルギー消費の指標として血糖値、また疲労の指標である血中乳酸値を試験前と試験後に測定し、運動持久力の評価基準として 1 分間に 5 秒または 5 回電気ショックを受けた時点での走行時間および走行距離を算出した。

ALAS1+/- マウスと野生型マウスで、運動後に血糖値の減少、乳酸値の増加が見られたが、ALAS1+/- マウスと野生型マウスの間では運動後における血糖値と乳酸値における有意な差異が見られなかった。若齢群 (9-11 週齢) では、ALAS1+/- マウスは野生型マウスと同程度の運動持久力を示したが、成体群 (24-27 週齢) では、ALAS1+/- マウスは野生型マウスに比べ、運動持久力が有意に低下していた。

以上の結果から、ALAS1+/- マウスではミトコンドリアの異常により運動持久力の低下がもたらされたと推測される。

【動物実験センターからのお知らせ】

1) 実験小動物の適正な注射麻酔薬について

(三種混合麻酔の紹介)

2) 適正な動物実験手技について

(各種投与法のポイント)

3) 新規疾患モデル動物の紹介

(糖尿病性早期肝癌発症モデル DIAR-nSTZ マウスについて)

○伊藤恒賢 (山形大学医学部メディカルサイエンス推進研究所動物実験センター)

1) 実験小動物の適正な注射麻酔薬について (三種混合麻酔の紹介)

従来から実験用マウス・ラットの麻酔薬としてペントバルビタール Na (商品名: ネプタール、ソムノペンチル等) が汎用されてきた。しかし、ペントバルビタール Na の単独投与は催眠効果があるものの、十分な鎮痛効果が得られないこと等から、現在では世界中で単独投与には用いられていない。その後、ケタミンとキシラジンによる混合麻酔が推奨されたが、数年前にケタミンが麻薬指定となったことから薬品の管理と使用には特別なステップが必要になっている。

一方、吸入麻酔薬であるイソフルランおよびセボフルランは動物にも侵襲性が低く良い麻酔薬であるが、安全に使用するためには麻酔濃度と流量をコントロールしなければならない。そのためには気化器が必要となるが、1 台 50 万円以上と高額である。動物実験センターでは SPF エリアとクリーンエリアにイソフルレンとセボフルレンの気化器を各 1 台 (計 4 台) 準備し実験者に貸与しているが、実験が重なった場合は実験時間の変更を余儀なくされている。

ところが最近になって、黒澤らが 3 種の麻酔薬を混合し、それを一度に投与できる三種混合麻酔法を報告し、良好な麻酔鎮痛効果を得ている。この麻酔薬は 3 種類の薬剤を混合するという煩わしさがあるものの、

安定した麻醉効果があり、混合した麻醉薬は調整してから6ヶ月間は保存できること、拮抗剤を応用することにより外科手術後に直ぐに覚醒させることができることなどから、最近の実験動物業界では徐々に普及し

てきている。今回は三種混合麻醉薬について山形大学での調整比率や麻醉効果および使用時の注意点などについて概説する。

三種混合麻醉薬の成分と商品名および製品濃度

成分	商品名	用途	製造販売元	製品濃度
塩酸メドミジン	ドミトール 10 ml (ドルベネ注)	動物用医薬品 鎮静・鎮痛	日本全薬工業 (株) (共立製薬 (株))	1 mg/ml × 10 ml
ミダゾラム	ドルミカム 注射液 10mg	麻醉導入薬 鎮静薬	アステラス製薬 (株)	10 mg/2 ml/ 管 × 10 管 10 管/箱
酒石酸 ブトルファノール	ベトルファール	動物用医薬品 鎮痛薬	Meiji Seika ファルマ (株)	5 mg/ml × 10 ml

拮抗剤の成分と商品名および製品濃度

成分	商品名	用途	製造販売元	製品濃度
塩酸アチパメゾール	アンチセダン (アチパメ注)	動物用医薬品 ドミトール 拮抗注射剤	日本全薬工業 (株)	5 mg/ml × 10 ml

調整法 (山形大学医学部メディカルサイエンス推進研究所動物実験センターの場合)

3 種混合麻醉 調整比率	ドミトール 0.15 ~ 0.3 mg/Kg	ドルミカム 2.0 ~ 4.0 mg/Kg	ベトルファール 2.5 ~ 5.0 mg/Kg	生理食塩水	最終調整液量
A マウス必要量 (BW1000g 分)	0.3 mg/0.3 ml /Kg	4 mg/0.8 ml /Kg	5 mg/1 ml /Kg	2.9 ml/Kg	5 ml/Kg (90 分麻醉) 0.05 ml/10 g
B ラット必要量 (BW1000g 分)	0.15 mg/0.15 ml /Kg	2 mg/0.4 ml /Kg	2.5 mg/0.5 ml /Kg	1.45 ml/Kg	2.5 ml/Kg (60 分麻醉) 0.25 ml/100 g

メドミジン拮抗薬 調整比率	アンチセダン (アチパメ注)	生理食塩水	最終調整液量
C マウス必要量 (BW1000g 分)	0.3 mg/0.6 ml/Kg	4.4 ml/Kg	5 ml/Kg 0.05 ml/10 g
D ラット必要量 (BW1000g 分)	0.15 mg/0.3 ml/Kg	2.2 ml/Kg	2.5 ml/Kg 0.25 ml/100 g

三種混合麻醉薬の投与量 (体重換算表)

マウス体重 (g)	10.0	20.0	30.0	40.0
投与量 (ml)	0.05	0.10	0.15	0.20

ラット体重 (g)	100	200	300	400
投与量 (ml)	0.25	0.50	0.75	1.00

三種混合麻醉薬と拮抗剤の使用法

【麻醉】

上記の通り調整された三種混合麻醉薬 (表中の A・B) はマウスとラットの共用である。同じ薬剤を上記の換算表に従って腹腔内投与 (ip) または皮下投与 (sc) することにより、マウスとラットに適正な麻醉状態が得られる。ただし、ラットの投与量は 60 分麻醉量であり、マウスの投与量は 90 分麻醉量であること、さらに麻醉の効き方に系統差があることから、実

験に用いる場合は少ない容量 (× 0.8 程度) で試してから実験に用いるようにする。

腹腔内投与の誤投与で麻醉が効かない場合は、投与量の 0.2 倍の投与量を追加投与し動物の様子をみる。

【覚醒】

動物を早期に覚醒させたい、または麻醉薬を過量投与してしまった等の場合は、処置後にメドミジン拮抗薬 (表中の C・D) を用い麻醉薬と同量を腹腔内または皮下に投与する。

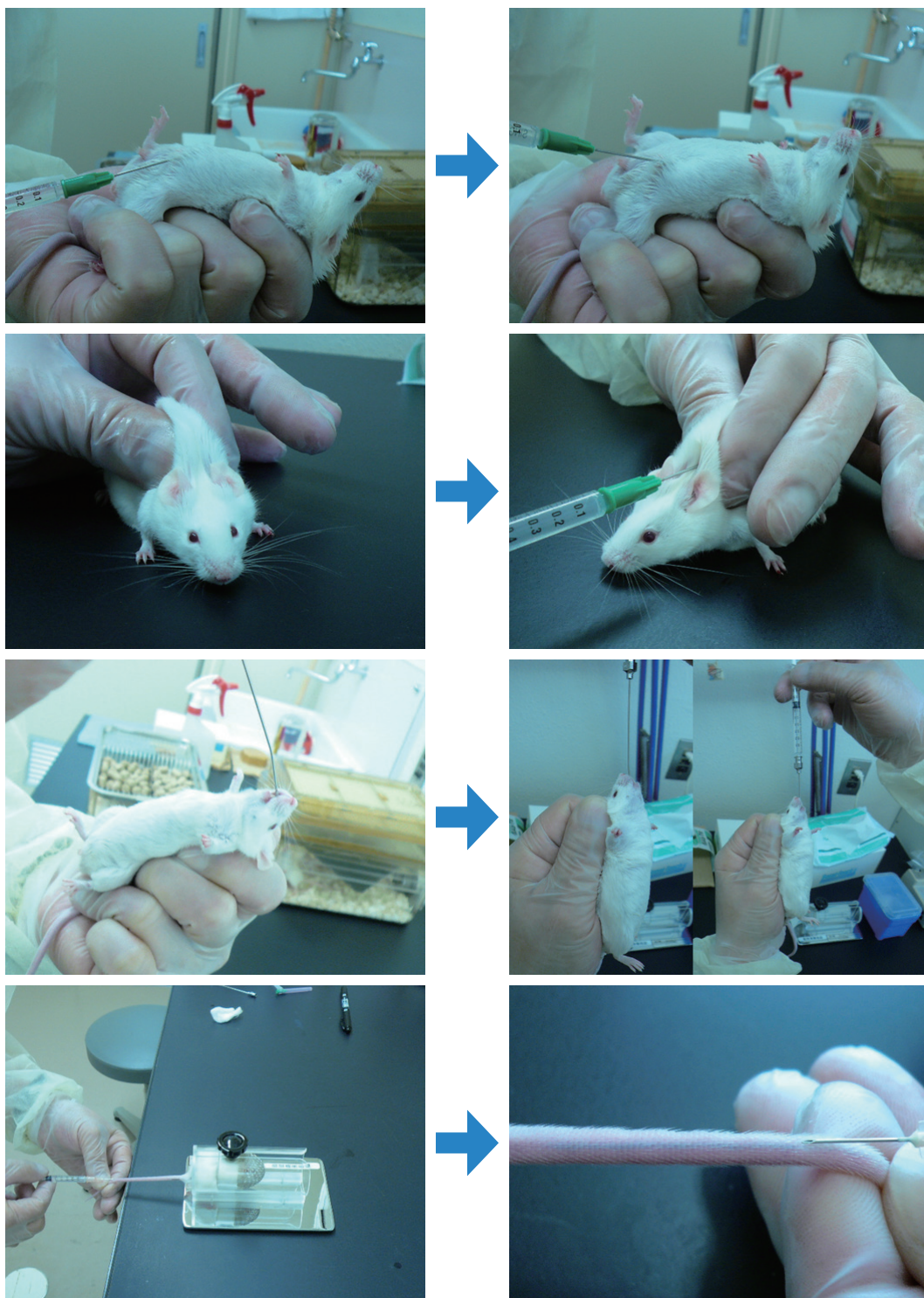
2) 適正な動物実験手技について（各種投与法のポイント）

動物実験の再現性を担保するためには、遺伝学的・微生物学的に統御された実験動物を統御された環境の下で飼育し実験されなければならない。

一方、実験者側の観点から動物実験の再現性を考え

た場合は、適正な動物実験手技を用いているか否かが最も重要な要素となる。

今回は、実験小動物の各種投与法のうち、腹腔内投与、皮下投与、静脈内投与、強制経口投与の各基本手技について、実験誤差を少なくするポイントを概説する。



3) 新規疾患モデル動物の紹介

(糖尿病性早期肝癌発症モデル DIAR-nSTZ マウスについて)

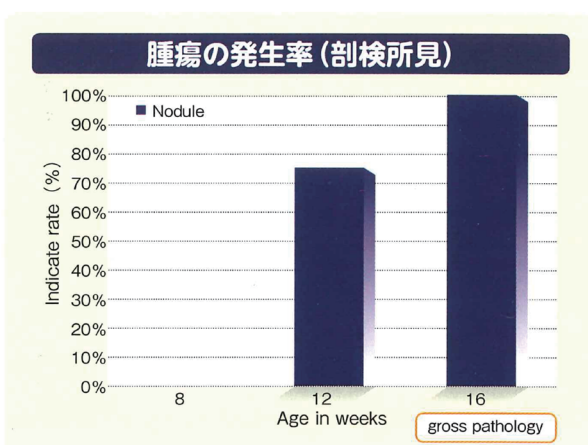
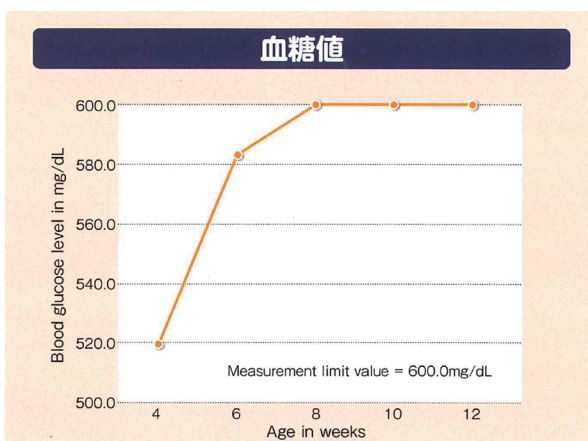
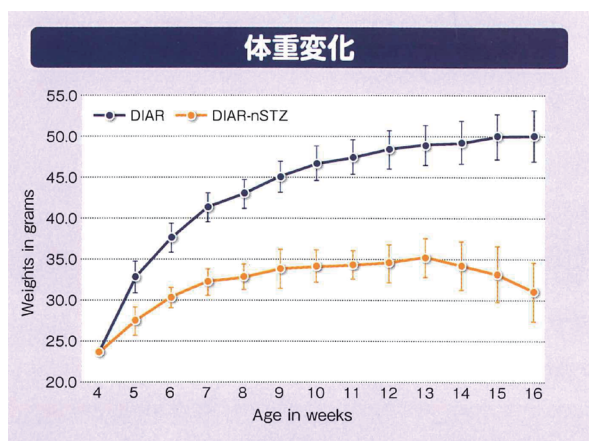
実験動物の選定は動物実験の新規性などの観点から、実験者が収集しておきたい情報の1つである。動物実験センターでは実験動物生産業者などから新規疾患モデル動物の情報を得た場合、パンフレットなどをセンター内に掲示して実験者に情報の提供を行っているところである。今回のセミナーでは新規開発途中の興味深い実験動物の情報を得たのでその特徴を紹介する。

DIAR-nSTZ マウスは新生仔時期に Streptozotocin (STZ) を投与することにより I 型糖尿病を誘発さ

せたマウスである。この動物は8週齢で血糖値が600mg/dl を越えるとともに16週齢頃には全例に肝細胞癌が認められることが特徴である。肝癌のモデル動物はこれまでも報告されてきたが、生後すぐに膵臓の β 細胞を破壊することで短期間に高血糖と肝癌を発症する希少なモデルである。

上記のように、実験動物の情報などが動物実験センターに届いた場合は2階実験者入口や1階の集中監視室前等に掲示するので、積極的に利用いただきたい。

また、動物実験についてのご相談、実験動物や飼育機器などに関する質問等、ご不明な点はセンター職員に問い合わせ願いたい。



文献 | Baba H, Tsuneyama K, et al. Neonatal streptozotocin treatment causes type 1 diabetes and subsequent hepatocellular Carcinoma in DIAR mice fed a normal diet. Hepatol Int. 2014